

Amer. J. Physiol. 185, 18 (1956). — 26. KUČEROVÁ, L. und A. ŠTORK, Čas. lék. česk. 101, 618 (1962). — 27. KUČEROVÁ, L. und A. ŠTORK, Čas. lék. česk. 101, 1137 (1962). — 28. PEZOLD, F. A., Klin. Wschr. 37, 132 (1959). — 29. PEZOLD, F. A., Dtsch. Arch. klin. Med. 205, 640 (1959). — 30. ROSENMAN, R. H., M. FRIEDMAN und S. O. BYERS, J. Clin. Invest. 35, 522 (1956). — 31. ROSENMAN, R. H. und M. FRIEDMAN, J. Clin. Invest. 36, 700 (1957). — 32. ROSENMAN, R. H., S. O. BYERS und M. FRIEDMAN, J. Clin. Invest. 36, 1558 (1957). — 33. MONKHOUSE, F. C. und R. G. MACKNESON, Canad. J. Biochem. Physiol. 36, 1065 (1958). — 34. AXENFELD, H., Wien. klin. Wschr. 68, 296 (1956). — 35. KUČEROVÁ, L., A. ŠTORK und E. FABIAN, Čas. lék. česk. — im Druck. — 36. HALLGREN, B., S. STENHAGEN, A. SVANBORG und

L. SVENNERHOLM, J. Clin. Invest. 39, 1424 (1960). — 37. HRSICH, P. F., Ann. int. Med. 41, 546 (1956). — 38. THANNHAUSER, S. J., Lipidoses. Diseases of the intracellular lipid metabolism. Grune and Stratton, New York and London (1958). — 39. ZÖLLNER, N. und S. J. THANNHAUSER, Thannhausers Lehrbuch des Stoffwechsels und der Stoffwechselkrankheiten. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1957). — 40. KRONDL, A., H. VAVŘÍNKOVÁ, Č. MICHALEC und andere, Čas. gastroenterol. 14, 129 (1960). — 41. PLACER, Z., A. KRONDL und Z. SLABOCHOVÁ, Čas. gastroenterol. 13, 145 (1959). — 42. SKOŘEPA, J., Acta Univ. Carol. Med. 4, 181 (1959). — 43. ŠTORK, A. und L. KUČEROVÁ, Čas. lék. česk. 101, 833 (1962).

Doz. Dr. A. Štork
I. Med. Klinik der Karls-Universität
Prag 2, Ú nemocnice 2

Zur Kenntnis der Lipase-Bestimmung nach Willstätter

Von C. G. VOM BRUCK

Aus den Forschungslaboratorien der Nordmark-Werke Hamburg, Werk Uetersen.

(Der Schriftleitung zugegangen am 16. Mai 1964)

Bei der Bestimmung der Pankreaslipase nach der Methode von WILLSTÄTTER in der Modifikation von VOGEL und LAEVERENZ wurde die Fettsäurebestimmungsmethode verbessert. Die Fettsäuren werden aus dem angesäuerten Spaltansatz durch Benzol extrahiert und photometrisch als Kupfersalz bestimmt. Mit dieser Methode wurde die Abhängigkeit der Olivenölsplattung von Lipasemenge erneut untersucht und eine von der von WILLSTÄTTER angegebenen abweichende Dosiswirkungskurve angegeben.

In the estimation of pancreatic lipase, according to WILLSTÄTTER, modified by VOGEL and LAEVERENZ, the fatty acid determination was improved. The fatty acids are extracted from the acidified hydrolysis mixture with benzene and determined photometrically as the copper salt. With this method, the dependence of the hydrolysis of olive oil on the amount of lipase was reinvestigated; a dose-activity curve, different from that of WILLSTÄTTER, is given.

Die von WILLSTÄTTER, WALDSCHMIDT-LEITZ und MEMMEN (1) 1923 veröffentlichte Lipase-Bestimmungsmethode wurde 1935 von VOGEL und LAEVERENZ (2) durch Erhöhung der Albumin- und Calciumchlorid-Konzentration und Zufügen von Natriumoleat zur Sicherung einer gleichmäßigen Emulsionsbildung verbessert. Diese modifizierte WILLSTÄTTER-Methode ist seitdem vielfach zur Ermittlung der Lipasegehalte von Fermentpräparaten verwandt worden, besonders zur Beurteilung technisch hergestellter Pankreatine.

Neben der WILLSTÄTTER-Methode ist eine große Zahl anderer Lipase-Bestimmungsmethoden angegeben worden (vgl. 3), die sich nach Verwendung von wasserlöslichen, bzw. praktisch wasserunlöslichen Estern als Substrat, in zwei Gruppen einteilen lassen. Nach Untersuchungen von DESNUELLE und seiner Schule (4) ist die Pankreas-Lipase eine Spezial-Esterase, die bevorzugt an der Grenzfläche Ölphase/Wasserphase wirkt, d. h., daß die wasserunlöslichen Fette, wie z. B. Olivenöl, ideale Substrate für die Pankreas-Lipase sind. Die Ester niedriger Fettsäuren werden zwar durch Lipasen, aber auch durch einfache Esterasen gespalten, was sich nachteilig auf die Spezifität der betreffenden Methoden auswirkt. Die wasserlöslichen Ester der höheren Fettsäuren, wie z. B. Produkte der Tween-Gruppe, werden nach DESNUELLE (4) durch Pankreaslipase nicht gespalten, sondern durch ein diese begleitendes Ferment „Tweenase“, deren Abtrennung von der Pankreaslipase möglich war.

Im folgenden sind zwei Methoden beschrieben, mit denen die aus Olivenöl im VOGEL-LAEVERENZ-Splatt-

ansatz freigesetzten Fettsäuren genauer als nach der von WILLSTÄTTER angegebenen Titrationsmethode bestimmt werden können; außerdem wird eine neue Lipase-Splattungskurve bei Verwendung von Pankreatin angegeben.

Bei Extraktion mit Benzol und 5 Tropfen konz. Salzsäure nach den Angaben von LASO-WASEM (5) werden nur etwa 50% der Fettsäuren erfaßt, obwohl der pH-Wert der Mischung 0,8–0,9 beträgt. Durch Zusatz von 1 ml konz. Salzsäure (pH etwa 0,1) werden bei einmaliger Extraktion mit Benzol $85 \pm 2\%$ (Standardabweichung; $n = 10$) der Fettsäuren erfaßt, wie durch Zugabe von 600–2400 μM Ölsäure ermittelt wurde. — Die Extraktion mittels Isopropylalkohol/n-Heptan/Wasser nach DOLE (6), Chloroform/Methanol/Wasser nach FOLCH (7) und BLIGH und DYER (8) bzw. Isopropylalkohol/Benzol/Wasser ergaben keine besseren Ausbeuten. Der Fettsäuregehalt wurde durch Titration mit methanolischer Natronlauge und dem Mischindikator nach TIWARI (9) bestimmt.

Noch einfacher können jedoch die Fettsäuren photometrisch nach einem Verfahren, das von BAKER¹⁾ (10) angegeben wurde, bestimmt werden. Die benzolische Lösung der Fettsäuren wird mit einer Kupferacetatlösung geschüttelt, wodurch sich benzollösliche, grüngefärbte Kupfersalze der Fettsäuren bilden. Deren Ex-

¹⁾ Herrn Prof. WOLF und Herrn Dr. SARAU möchte ich auch an dieser Stelle für den Literaturhinweis und methodische Angaben herzlich danken.

tinktionsmaximum ist abhängig von der verwandten Fettsäure; bei der durch Spaltung von Olivenöl entstehenden Fettsäure (hauptsächlich Ölsäure) liegt das Extinktionsmaximum bei 680 m μ . Bei Extinktionen zwischen 0,1 und 2,0 besteht eine lineare Abhängigkeit zur Konzentration der Fettsäuren (Abb. 1). — Die photometrisch bestimmten Fettsäure-Konzentrationen stimmen sehr gut mit durch Titration ermittelten überein (Tab. 2).

Die Lipase-Aktivität einer größeren Anzahl von Pankreatin-Präparaten wurde nach dem modifizierten WILLSTÄTTER-VOGEL/LAEVERENZ-Verfahren untersucht. Im Vergleich dazu wurden Bestimmungen nach den Angaben von VOGEL und LAEVERENZ durchgeführt. Dabei wurde berücksichtigt, daß die pH-Angabe von 8,9 des NH₃-NH₄Cl-Puffers sich auf Messung bei 30° bezieht, bei 20° hat dieser Puffer einen pH von 9,2. Die Lipase-einheiten-Olivenölsplattungskurve nach VOGEL und LAEVERENZ liefert Lipasewerte (LW = Lipaseeinheiten [LE] in 10 mg Fermentpräparat), die bei Einsatz steigender Lipasemengen kleiner werden. Diese Kurve aus den in Tabelle 1 zusammengestellten Werten ist in Abbildung 2 als Kurve 1 (gepunktet) wiedergegeben. — Die Inkonsistenz der Lipasewerte trifft auch für die VOGEL/LAEVERENZ-Werte zu, wie die Kolonne 6 zeigt.

Bei einer 20-proz. Spaltung des Olivenöls werden nach der VOGEL/LAEVERENZ-Kurve und nach der WILLSTÄTTER-Kurve (12) gleiche Lipase-Einheiten gefunden; bei geringerer Spaltung werden voneinander ab-

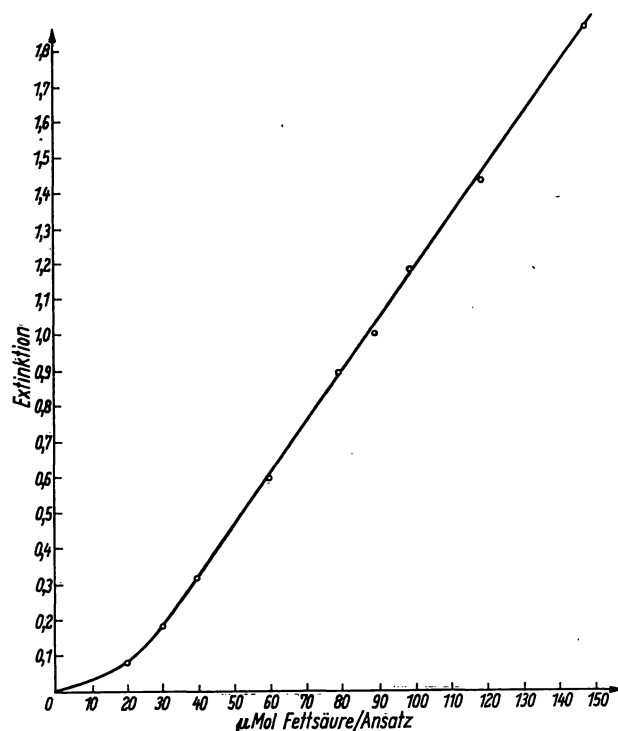


Abb. 1

Abhängigkeit der Extinktion bei 680 m μ von der Ölsäure-Konzentration

5 m/ benzolische Ölsäure-Lösung (aus Destillat-Olein „hell“; nach Titration 99,9% Fettsäure) mit 4 m/ 5-proz. Kupferacetatlösung 5 Min. geschüttelt; Extinktion der Benzolphase im Zeiß-PMQ2-Spektralphotometer bei 680 m μ und 1,000 cm Schichtdicke gemessen

Tab. 1
Bestimmungswerte von VOGEL und LAEVERENZ

mg Pankreatin pro Ansatz	Methode WILLSTÄTTER			Methode VOGEL-LAEVERENZ			Neuberechnete ¹⁾ LE
	% Spaltung	LE	% Spaltung	LE	LW		
4	8,7	0,20	13,0	0,40	1,00		0,28
8	15,5	0,54	17,4	0,65	0,81		0,56
12	19,8	0,78	20,6	0,82	0,68		0,85
16	—	—	22,4	0,92	0,58		1,13
20	25,4	1,28	24,6	1,10	0,56		1,41
24	—	—	25,7	1,34	0,56		1,68

¹⁾ Berechnet auf ein Pankreatin mit LW = 0,70.

Tab. 2
Fehlerbreite der modifizierten WILLSTÄTTER-VOGEL/LAEVERENZ-Methode bei Pankreatin-Einwaagen von 20 ± 1 mg

Pankreatin- Charge	Anzahl der Bestimmungen	Lipase-Werte ± Standardabweichung ³⁾		Δ LW (Tit. — Photometr.)	VOGEL-LAEVERENZ-Methode	
		Titration	Photometrie		LW ²⁾	LW ²⁾
P 585—9 III	12	0,299 ± 0,019	0,299 ± 0,018	0,000 ± 0,032	0,27	0,18
P 628—33 II	8	0,286 ± 0,031	0,297 ± 0,030	— 0,011 ± 0,024	—	—
P 638—43 III	12	0,260 ± 0,013	0,264 ± 0,008	— 0,004 ± 0,049	0,24	0,16
P 644—8 I	16	0,219 ± 0,005	0,230 ± 0,008	— 0,011 ± 0,034	0,23	0,15

¹⁾ Werte berechnet nach Kurve 1, Abbildung 2.

²⁾ Werte berechnet nach Kurve 3, Abbildung 2 = korrigierte LW

³⁾ Zur Titration 10 m/Benzolphase, zur photometrischen Bestimmung 1 und 2 m/bzw. 5 m/ bei Blindansätzen. Bei der VOGEL-LAEVERENZ-Methode wurde auf einen mittelblauen Farbton des Thymolphthalein titriert. $LW = \frac{\sum LW_i}{N}$.

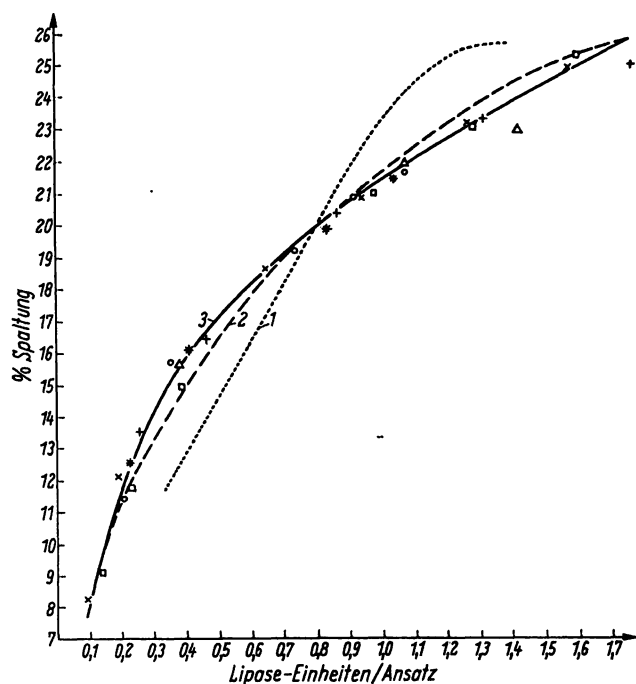


Abb. 2

Lipaseeinheiten-%Olivenölspaltungs-Kurven

..... Kurve 1: nach WILLSTÄTTER/VOGEL, LAEVERENZ

----- Kurve 2: korrigierte Kurve 1

———— Kurve 3: neue Lipaseeinheiten-%Spaltungskurve

+ Pankreatin P 585—9 II

□ Pankreatin P 684/R 1

x Pankreatin P 664—8 I

* Pankreatin P 669—74 II

Δ Pankreatin P 663—8 IV

○ Pankreatin P 775

weichende Werte erhalten. Da nach graphischer Ermittlung — aus den Werten der Tabelle 1 — 11,5 mg des VOGEL/LAEVERENZ-Pankreatins eine 20-proz. Spaltung des Olivenöls bewirken, enthalten diese — nach Kurve 1 — 0,79 LE. Auch nach WILLSTÄTTER entsprechen 20% Olivenölspaltung 0,79 LE. Das VOGEL/LAEVERENZ-Pankreatin hat also (bei 20% Olivenölspaltung) einen LW von 0,70. Unter Zugrundelegung dieses LW läßt sich aus den mitgeteilten Pankreatin-Einwaagen und %Spaltungen eine neue Kurve (Abb. 2, Kurve 2, gestrichelt) errechnen, bei der der LW des VOGEL/LAEVERENZ-Pankreatins innerhalb der Fehlergrenze unabhängig von der Pankreatin-Einwaage ist.

Zur Kontrolle dieser aus den VOGEL/LAEVERENZ-Werten neu errechneten LE-Spaltungskurve wurde von einer größeren Anzahl Pankreatine die %-Olivenölspaltung bei unterschiedlichen Pankreatineinwaagen bestimmt. Durch Auftragen der Pankreatinmenge gegen die %-Olivenölspaltung wurde graphisch für jedes Präparat die Pankreatinmenge ermittelt, die 20% des Olivenöls spaltet und somit nach der oben getroffenen Festlegung 0,79 LE enthält. Über den daraus ermittelten LW wurden die verwandten Pankreatineinwaagen in LE pro Ansatz umgerechnet und nun die LE gegen %-Olivenölspaltung aufgetragen. In der Abbildung 2 sind diese Meßwerte für 6 verschiedene Pankreatine wiedergegeben. Wie man sieht, liegen die Punkte in der Nähe der neu berechneten VOGEL/LAEVERENZ-Kurve, jedoch im allgemeinen bei über 20% Spaltung unter, im Bereich 12—20% Spaltung dagegen über der Kurve. Durch diese Meßpunkte wurde eine Kurve 3

(ausgezogen) so gelegt, daß alle Meßpunkte möglichst nahe an der neuen Kurve liegen. Die drei Kurven schneiden sich wegen obiger Festlegung am Punkt 20% Spaltung.

Bei Verwendung der neuen Kurve ist der LW auch anderer Pankreatine innerhalb der Fehlergrenze unabhängig von der Pankreatineinwaage konstant. Merkbare Abweichungen können dann auftreten, wenn bei wenig lipaseaktiven Pankreatinen eine Einwaage von mehr als 30 mg/Bestimmungsansatz verwandt wird. Die Genauigkeit dieser modifizierten Lipase-Bestimmungsmethode im Vergleich zu der VOGEL/LAEVERENZ-Methode ist aus der Tabelle 2 zu entnehmen. Die Standardabweichung s , gemittelt über alle Bestimmungen der Tabelle 2, beträgt bei Bestimmung durch Titration 6,3%, bei photometrischer Bestimmung 5,7%. Die nach der ursprünglichen VOGEL/LAEVERENZ-Methode bestimmten Lipasewerte wurden von uns niedriger gefunden; durch den breiten Umschlagsbereich des Thymolphthaleins ist eine gewisse Willkür des Titrationsendpunktes gegeben. Es ist durchaus möglich, durch geeignete Wahl des Titrationsendpunktes eine bessere Übereinstimmung mit unseren Werten zu erzielen.

Nach DESNUELLE (4) sollte Lipase nur in heterogenen Systemen bestimmt werden. MARCHIS-MOUREN, SARDA und DESNUELLE (11) verwenden Olivenöl als Substrat und halten durch laufende Laugenzugabe während der Bestimmung den pH-Wert konstant auf 9,0. Wenn die Lipasemenge niedrig gehalten wird, besteht dabei eine lineare Beziehung des Laugenverbrauchs zur Spaltungszeit. Linearität wurde von uns bis etwa 0,2 mg Pankreatin 684/R1 pro Bestimmungsansatz gefunden. Da Pankreatine im allgemeinen inhomogen sind — intensive Mahlung kann zu Fermentschädigung führen —, können bei kleinen Einwaagen erhebliche Fehlmessungen erfolgen. Es kann zwar aus einer größeren Pankreatineinwaage erst ein Glycerinauszug hergestellt werden, jedoch bleibt dann die Unsicherheit der vollständigen Extraktion.

Die vorliegende modifizierte Methode ist besonders geeignet zur routinemäßigen Lipasebestimmung in Pankreatinen, wobei der individuelle Einfluß des Untersuchers weitgehend ausgeschaltet ist. Die Methode dürfte überall dort mit Vorteil einsetzbar sein, wo in einem inhomogenen Material höhere Lipasekonzentrationen auftreten.

Methodik

Modifizierte WILLSTÄTTER-VOGEL/LAEVERENZ-Methode

Reagenzien

2,5 g Olivenöl, spanisch, rein (Verseifungszahl 185,7)

5,0 ml Wasser

2,0 ml $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer (1 Vol. 1 N NH_4OH , 2 Vol. NH_4Cl -Lösung; pH bei 20°: 9,20; bei 30°: 8,90.

2,0 ml 1,6-proz. CaCl_2 -Lösung aus Calciumchlorid, geschmolzen p. a. (Merck Nr. 2083).

2,0 ml 2,4-proz. Eialbumin-Lösung, aus Eialbumin Erg. B. 6, trocken (Merck Nr. 968), täglich frisch bereitet und vor Gebrauch filtriert.

2,0 ml/1,6-proz. Natriumoleat-Lösung, aus Natriumoleat, reinst (Merck Nr. 6554), täglich frisch bereitet und vor Gebrauch filtriert.

0—30 mg Pankreatin oder anderes Lipasepräparat.

1,0 ml/ Salzsäure p. a., 37-proz., $d = 1,19$.

20,0 ml/ Benzol, rein, destilliert.

4 ml/ 5-proz. Kupferacetat-Lösung, 5 g $\text{Cu}(\text{CH}_3 \cdot \text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, kristallisiert rein, werden in 95 ml/ Wasser gelöst und die trübe Lösung durch Seitz-AW-Filterschicht filtriert.

Ausführung der Bestimmung

2,50 g Olivenöl werden in ein verschließbares Zentrifugenglas eingewogen, nacheinander mit 5 ml/ Wasser, 2 ml/ $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer (pH = 9,20), 2 ml/ 1,6-proz. CaCl_2 -Lösung, 2 ml/ 2,4-proz. Albumin-Lösung und 2 ml/ 1,6-proz. Natriumoleat-Lösung zugegeben und einige Sekunden kräftig durchgeschüttelt. Anschließend wird das Lipasepräparat zugesetzt, sofort 30 Sek. geschüttelt und das Gefäß genau eine Stunde lang in einem Schüttelthermostat (160 Schwingungen/Min.) bei 30° belassen. Danach wird die Spaltung durch 1 ml/ konz. Salzsäure abgestoppt, 30 Sek. kräftig geschüttelt und nach Zugabe von 20 ml/ Benzol 1 Min. kräftig geschüttelt. Um eine bessere Trennung zu erreichen, wird die Mischung 20 Min. bei 6000 U/Min. verschlossen zentrifugiert. Zur photometrischen Bestimmung der freien Fettsäuren werden 1 oder 2 ml/ der Benzolphase mit Benzol auf 5 ml/ aufgefüllt und nach Zusatz von 4 ml/ 5-proz. Kupferacetat-Lösung 5 Min. auf der Maschine geschüttelt. Anschließend wird verschlossen 1 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert und von der klaren Benzolphase die Extinktion bei 680 m μ gegen Reagenzien-Leerwert (Benzolphase aus 5 ml/ Benzol und 4 ml/ 5-proz. Kupferacetat-Lösung) gemessen. — Zur Ausführung einer Blindbestimmung wird das Pankreatin erst nach Zusatz der Salzsäure zugegeben. Zweckmäßig werden hier für die photometrische Bestimmung 5 ml/ der Benzol-Phase verwandt.

Eine Steigerung der Schüttelgeschwindigkeit auf 250 Schwingungen/Min. beschleunigt die Spaltung nicht. Auch eine Verlängerung der Schüttelzeit bei der Extraktion des Ansatzes mit Benzol auf 15 Min. oder Erhöhung der Benzolmenge auf 40 ml/ ergab keine Erhöhung der Fettsäure-Extraktion.

Berechnung des Lipasewertes (LW)

Aus den Extinktionen des Bestimmungs- bzw. Blindansatzes werden an der Eichkurve (Abb. 1) die μM Fettsäuren pro Ansatz abgelesen. Die Differenz der beiden Fettsäurewerte ($\Delta \mu\text{M FS}$), eingesetzt in die Formel 1, ergibt die Prozentspaltung des Olivenöls.

$$\% \text{ Spaltung} = \frac{\Delta \mu\text{M FS} \cdot 20 \text{ ml}^3 \cdot 100}{\text{EF} \cdot \text{UF} \cdot \text{VZ} \cdot \text{g Olivenöl} \cdot \text{ml BE}}$$

$$\% \text{ Spaltung} = \frac{20 \cdot 100 \cdot \Delta \mu\text{M FS}}{0,85 \cdot 17,82 \cdot 185,7 \cdot 2,5 \cdot \text{ml BE}}$$

$$\% \text{ Spaltung} = 0,285 \frac{\Delta \mu\text{M FS}}{\text{ml BE}} \quad (\text{Formel 1})$$

¹⁾ Benzol zum Ausschütteln.

EF = 0,85: Extraktionsfaktor berücksichtigt, daß unter den Bestimmungsbedingungen nur 85% der FS extrahiert werden (s. Tab. 1).

UF = 17,82: Umrechnungsfaktor von μM auf mg KOH. 1 mg KOH entspricht 17,82 μM KOH.

VZ = 185,7: Verseifungszahl des Olivenöls.

BE = Benzolextrakt, für die photometrische Bestimmung eingesetzt.

Aus der Kurve 3, Abbildung 2, werden über die ermittelte % Olivenölspaltung die zugehörigen Lipase-Einheiten und der

$$\text{Lipasewert nach LW} = \frac{\text{LE} \cdot 10}{\text{mg Pankreatin}} \text{ berechnet.}$$

Bestimmung der Fettsäure durch Titration

10 ml/ klare Benzolphase werden in einem 100 ml/ Erlenmeyer-Kolben mit 1 ml/ Methanol p. a. und 1 Tropfen Mischindikator nach TIWARI (9) versetzt und mit 0,1 n methanolischer Natronlauge titriert. Der Indikator schlägt von gelb über hellgrün-hellgrau scharf nach blau-violett um.

$$\Delta \mu\text{M Fettsäure} = (\text{ml NaOH}^{\text{Best.}} - \text{ml NaOH}^{\text{Blind}}) \cdot F_{\text{NaOH}} \cdot 100$$

Zur Herstellung des Mischindikators nach TIWARI werden 120 mg Phenolrot, 40 mg Kresolrot und 40 mg Bromthymolblau in 50 ml/ Methanol p. a. suspendiert und 0,1 n alkoholische Natronlauge zugesetzt, bis vollständige Auflösung eingetreten ist.

Die Berechnung des LW erfolgt wie bei der photometrischen Bestimmung angegeben.

Gewinnung des Pankreatins P 684/R1

Ein dem von VOGEL und LAEVERENZ verwandten Pankreatin ähnliches Lipase-Präparat wird wie folgt erhalten:

Alle Operationen bis zur Ätherextraktion werden bei —8 bis —10° durchgeführt. 30 g eines Pankreasbreis, der durch schnelle Zerkleinerung von gefrorenem Schweinepankreas erhalten wird, wird in 150 ml/ Aceton von —5° unter Kühlung mittels Ultra-Turrax²⁾ suspendiert und 30 Min. gerührt, dann 15 Min. bei 6000 U/Min. zentrifugiert. Der Rückstand wird in gleicher Weise noch zweimal mit je 60 ml/ Aceton extrahiert und dann mit Hilfe eines dicken Glasstabes in 60 ml/ peroxydfreiem Äther suspendiert. Nach 30 Min. Stehen bei Zimmertemperatur wird 15 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert und nochmals in gleicher Weise mit Äther extrahiert. Dieser Rückstand wird in einer Soxhlet-Apparatur 8 Stdn. mit peroxydfreiem Äther extrahiert und dann über Nacht an der Ölpumpe über P_2O_5 getrocknet, wobei 6,0 g Pankreatin P 684/R1 erhalten werden. Diese werden bei —5° über Natronkalk aufbewahrt.

Fräulein HILTRUD ROHLOFF danke ich für sehr sorgfältige und geschickte Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

²⁾ Hersteller: Fa. Janke und Kunkel, Staufen/Breisgau.

Literatur

1. WILLSTÄTTER, R., E. WALDSCHMIDT-LEITZ und F. MEMMEN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 125, 93 (1923). — 2. VOGEL, L. und P. LAEVERENZ, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 234, 176 (1935). — 3. v. BRUCK, C. G., Wissenschaftliches Beiblatt zur „Materia Medica Nordmark“ Nr. 25, 3. Aufl. (1963). — 4. SARDA, L., G. MARCHIS-MOUREN und P. DESNUELLE, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 30, 224 (1958). — 5. LAZO-WASEM, E. A., J. pharmac. Sci. 50, 999 (1961). — 6. DOLE, V. P. und H. MEINERTZ, J. biol. Chemistry 235, 2595 (1960). — 7. FOLCH, J., M. LEES

und G. H. S. STANLEY, J. biol. Chemistry 226, 497 (1957). — 8. BLIGH, E. G. und W. J. DYER, Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911 (1959). — 9. TIWARI, R. D., K. C. SRIVASTAVA und J. P. SHARMA, Z. analyt. Chem. 187, 161 (1962). — 10. BAKER, D., 141. Meetg. Amer. Chem. Soc., Washington 1962, Abstr.-Bd. 17 A 45. — 11. MARCHIS-MOUREN, G., L. SARDA und P. DESNUELLE, Arch. Biochem. Biophysics 83, 309 (1959). — 12. EICHORN, F., in: Die Methoden der Fermentforschung von E. BAMANN u. K. MYRBÄCK, S. 2933, Leipzig (1940).

Dr. C. G. vom Bruck
2000 Hamburg-Rissen, Klövensteenweg 97